

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-189781

(43)Date of publication of application : 12.07.1994

(51)Int.Cl.

C12P 21/00
C12P 21/08
// C12N 5/02
(C12P 21/00
C12R 1:91)
(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : 04-346342

(71)Applicant : MITSUI TOATSU CHEM INC

(22)Date of filing : 25.12.1992

(72)Inventor : SHIMAZAKI YUKIO
FUKUDA TAMOTSU
KUSUHARA NOBUMI
AZUMA TATSUO
MURANAKA HIDEKAZU
TAKAGI SHIRO
SATOZAWA NOBORU
IKEDA ICHIRO
KAWASHIMA NOBUHIRO
AIKAWA TOSHIKAZU

(54) STABILIZATION OF BIOACTIVE PROTEIN IN CULTURE SOLUTION

(57)Abstract:

PURPOSE: To recover a bioactive protein in a stable state, in production of the bioactive protein by perfusion culture of an animal cell.

CONSTITUTION: pH of the recovered solution continuously obtained in perfusion culture of an animal cell is adjusted within a range of 6.0 to 7.0. Thereby, the bioactive protein can be prevented from being decomposed by a protease and the protein is stabilized.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-189781

(43)公開日 平成6年(1994)7月12日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 1 2 P 21/00	A	8214-4B		
	B	8214-4B		
21/08		8214-4B		
// C 1 2 N 5/02		8412-4B		
		8412-4B		
			C 1 2 N 5/ 00	E
			審査請求 未請求	請求項の数 2(全 4 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-346342	(71)出願人	000003126 三井東圧化学株式会社 東京都千代田区霞が関三丁目 2 番 5 号
(22)出願日	平成 4 年(1992)12月25日	(72)発明者	島崎 幸雄 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学 株式会社内
		(72)発明者	福田 保 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学 株式会社内
		(72)発明者	楠原 信海 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学 株式会社内
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 培養液中の生理活性タンパク質の安定化方法

(57)【要約】

【目的】 動物細胞を灌流培養し生理活性タンパク質を生産する方法において、生理活性タンパク質を安定な状態で回収する方法を提供する。

【構成】 動物細胞を灌流培養して連続的に得られる回収液のpHを6.0から7.0の範囲に調整することによりタンパク質分解酵素による生理活性タンパク質の分解を防ぎ、該タンパク質を安定化させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 動物細胞を灌流培養して生理活性タンパク質を生産する方法において、連続的に得られる回収液のpHを6.0から7.0の範囲に調整することによる、培養液中に産生された生理活性タンパク質の安定化方法。

【請求項2】 生理活性タンパク質がモノクローナル抗体である請求項1記載の安定化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、動物細胞の培養液中に産生された生理活性タンパク質の安定化方法に関するものである。詳しくは、動物細胞を灌流培養したとき、連続的に得られる培養液中の生理活性タンパク質の安定化方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】動物細胞培養は、有用な生理活性タンパク質を生産するに当たって重要な過程である。この培養方法としては、実験室レベルでは主にフラスコやプレート等を用いた比較的小規模な方法が取られている場合が多いが、比較的大量に培養を行い目的物質を得ようとする場合、大型の培養槽を用いた回分培養あるいは灌流培養が行われている。中でも灌流培養は、新たな栄養分の供給と老廃物の排出を連続的に行うことが可能であることから、回分培養に比べてより細胞の生育に適した条件を長期間維持することが可能である。

【0003】一般に、細胞培養による物質生産においては、それぞれの細胞の生育あるいは物質生産に適した培養条件についての詳細な検討が行われる。すなわち、培地中に含まれる栄養成分、培養中の温度、pH、溶存酸素濃度、培養液の攪はん速度、あるいは培地の灌流速度等さまざまな方面からの検討の結果をもとに、適した条件にコントロールされる場合が多い（例えばWO 88/01643）。

【0004】灌流培養を行った場合の回収液は一般に回収ラインを通して回収タンクに一時的に保存される。回収液の保存は、生理活性タンパク質の安定化を考慮し、通常低温でなされる場合が多いが、培養槽内で行っているようなさまざまな条件のコントロールはなされず、通常は温度管理程度しか行われない。

【0005】このような培養条件下で生産された生理活性タンパク質が、上記のような条件にコントロールされた培養槽内においてもなおかつ分解される場合がある。これは、細胞により生産されたあるいは死滅により細胞内部から放出されたタンパク質分解酵素による場合が多い。このような分解を防ぐ目的で、しばしば培地中にタンパク質分解酵素に対する阻害剤を添加することが行われる。しかしこのような分解活性を示す酵素の性質は未知な場合が多く、該酵素の分解活性を十分抑えるにはその阻害剤の検索と有用性の検討を十分に行う必要があ

り、必ずしも目的にかなった阻害剤が見つかるというわけではない。また、仮に有用な阻害剤が得られたとしても、細胞の生育に害を与えないような添加条件の検討が必要となることは言うまでもなく、細胞の生育にとって無害でかつタンパク質分解活性を十分に阻害する有用な阻害剤の使用が困難である場合が多い。しかも、阻害剤添加条件下で生産された生理活性タンパク質を例えば医薬品レベルで用いる場合、異物としての阻害剤は生体内においてしばしば有害な作用を及ぼすため、精製工程での目的タンパク質との分離等安全面からの確認を十分に行う必要がある。また、阻害剤は一般に高価な場合が多く、生理活性タンパク質生産のコストを高めることになり不都合である。

【0006】一方、培養液中に生産された生理活性タンパク質が回収液として一時的に保存される過程において分解を受ける場合がある。この場合、仮に生理活性タンパク質が培養槽内で安定である場合でも、回収液として一時的に保存される過程で分解されることがあり、このような現象の原因は不明であった。そしてこのための対策として、培養液の場合と同様にタンパク質分解酵素に対する阻害剤の添加がなされていた。このように、培養液および回収液のどちらにおいても生理活性タンパク質の分解を防止するためには阻害剤の添加以外に有効な対策がなかったが、阻害剤の添加は上述のとおり問題点があり、阻害剤を添加せずに生理活性タンパク質の分解を防止する方法が希求されていた。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、動物細胞を灌流培養し生理活性タンパク質を生産する方法において、生理活性タンパク質を安定な状態で回収する方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、動物細胞を灌流培養し生理活性タンパク質を生産する方法において、培養槽内で一般にpHの調整のために添加された炭素ガスが放出されてpHの上昇が起こること、そして回収液中での生理活性タンパク質の分解が回収液のpHの上昇と関連していることを発見した。そして、回収液のpHの上昇を抑えるべく該回収液のpHを6.0から7.0に調整することにより生理活性物質を安定な状態で回収することが可能であることを見だし本発明を完成するに至った。

【0009】即ち、本発明は動物細胞を灌流培養し生理活性タンパク質を生産する方法において、連続的に得られる回収液のpHを6.0から7.0の範囲に調整することによる、培養液中に産生された生理活性タンパク質の安定化方法を提供するものである。

【0010】以下本発明を具体的に説明する。本発明で使用される動物細胞は哺乳動物由来の細胞であり、その

動物種は問わない。また、その細胞は遺伝子組み換えの手法により生理活性タンパク質の遺伝子が組み込まれたものでも良く、細胞融合技術により作製された融合細胞あるいは各種ウイルスを用いた形質転換手法で作製したものでも良く、正常細胞でもかまわない。

【0011】本発明の生理活性タンパク質は、生体内で重要な生理活性を示すタンパク質であり、酵素、ホルモン、成長因子あるいは抗体分子等があげられるが、本発明は生理活性タンパク質の種類を問わず使用できる。

【0012】本発明の動物細胞の培養は、灌流培養で行われる。細胞と培養液との分離は、膜分離、重力沈降、あるいは遠心分離等が用いられるが、そのいずれの方法をとっても良い。培養に用いられる培地は、動物細胞の培養に通常用いられるものであり、血清添加培地でも無血清培地でも良い。培養における温度、pH、溶存酸素濃度、培養液の攪はん速度、培地の灌流速度等の各種条件は、それぞれの動物細胞の生育あるいは物質生産に適した条件であることが望ましく、用いる細胞によって異なった条件になってもかまわなく、必ずしもこれらすべての条件をコントロールする必要はない。

【0013】回収液中の生理活性タンパク質の安定化を目的として調整されるpHは、目的生理活性タンパク質のpH安定性により異なるが、好ましくはpH6から7の範囲である。先に示した通り培養槽内では一般にpHの調整がなされ、これは主に二酸化炭素ガスと炭酸水素ナトリウム溶液の添加により行われる。しかしこのような培養液はそれ自体での緩衝作用は小さく、回収ラインを通る際あるいは回収タンク内において炭酸ガスの放出によるpHの上昇が起こる。このpH上昇により、培養槽内では抑制されていたタンパク質分解酵素活性が発現され、生理活性タンパク質の分解が引き起こされることが考えられる。従って、このpHの上昇した状態で培養液を回収し保存することは、タンパク質分解酵素による生理活性タンパク質の分解につながり、好ましくない。回収液のpHの調整はさまざまな方法で行うことが可能であり、回収タンクにあらかじめ緩衝液を添加してこれに回収する方法、連続的に緩衝液を添加しながら回収する方法、あるいは回収液のpHをセンサーでチェックしながら酸あるいは緩衝液等を添加して調整する方法等があるが、pHを保つ方法であればどのような方法であってもよ

い。pHの調整に用いられる緩衝液としては、通常用いられる有機酸や無機酸、及びそれらの塩等の化合物を単独あるいは複数混合して調製すればよく、有機酸、無機酸、およびそれらの塩としては、クエン酸、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、リン酸、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩酸、酢酸、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム、トリスヒドロキシアミノメタン、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等があげられるが、リン酸あるいはリン酸ナトリウムが特に好ましい。また、pH調整は緩衝液以外の酸及び塩基の添加によっても可能であり、塩酸、クエン酸、リン酸、酢酸、水酸化ナトリウム等があげられるが、特にリン酸が好ましい。

【0014】回収液を保存する温度は特に限定されないが、好ましくは18℃以下0℃以上である。

【0015】

【実施例】以下実施例を示して説明するが、本発明はこれに限られるものではない。

実施例1

コーン型沈降管付培養槽を用い、ヒト・モノクローナル抗体を産生する細胞株MP-5156（微工研条寄第2339号（FERM BP-2339））を灌流培養した。SF-101無血清培地（日水製薬（株））を用い、細胞数約 1×10^6 cells/ml、灌流速度1VVD、培養温度37℃、溶存酸素濃度2ppm、培養槽内のpH7.0の条件で培養を行った。なお、この際4℃に回収タンクを置き、タンク内にあらかじめ0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）100mlを入れて回収した場合、及びそのままの状態での回収した場合の2通りの回収方法を取り、それぞれ約1リットルの培養液を回収した。回収液の一部を4℃及び18℃に移し、この中に含まれるモノクローナル抗体の抗原結合活性を0日及び5日後に測定した。保存開始時の抗原結合活性を10とした時の、5日後の相対活性を表1（表1）に示した。回収液のpHを調整せずに保存した場合、5日後にはそのpHは7.7まで上昇し、このため抗原結合活性の多くは失われた。これに対し、緩衝液添加によりpH調整された場合は、抗原結合活性は良く保存されていた。

【0016】

【表1】

培養液の回収方法	回収液の pH	相対抗原結合活性	
		4℃保存	18℃保存
pH未調整	7.7	6	0
pH調整（緩衝液添加）	6.7	10	7

【0017】実施例2

コーン型沈降管付培養槽を用い、実施例1と同様に灌流培養した。この際、得られた回収液に等量の0.1Mリ

ン酸ナトリウム緩衝液（pHは6.0～7.8の範囲で調整）を混合し、これを4℃及び18℃に7日間放置し、回収液中に含まれるモノクローナル抗体の抗原結合

活性を測定した。保存開始時の抗原結合活性を10とした時の7日後の相対活性を表2（表2）に示した。回収液のpHが6.0から7.0の範囲で抗原結合活性は良く保存されていた。

【0018】実施例3

実施例1で示した細胞株を、同様の条件により灌流培養した。回収液のpH調整として、回収ラインの途中にpH調整タンクを設置し、回収液20容に対して0.1M

リン酸ナトリウム緩衝液（pH6.0）を1容の割合で添加混合し、回収液のpH調整を行った。回収液は0.2μmのフィルターを通過後4℃に保存した。その結果、回収液内の抗原結合活性は、5日間放置後も良く保存されていた。

【0019】

【表2】

培養液のpH	相対抗原結合活性	
	4℃保存	18℃保存
6.0	10	10
6.5	10	10
7.0	10	7
7.8	6	0

【0020】

【発明の効果】動物細胞を灌流培養し生理活性タンパク質を生産する方法において、本発明で示した培養液の回収方法を用いることにより、回収時の生理活性タンパク質の分解を最小限に抑えた生理活性タンパク質の安定化が可能である。生理活性タンパク質は広い用途で用いられており、その有用性は高い。なかでも医薬品として生産される場合、生理活性タンパク質の分解を最小限に抑

えた安定な条件での生産は重要であり、本発明で示した方法が有用な手段となり得る。また、本方法で示した培養液の回収方法は、灌流培養した場合の回収液への適用のみならず、例えばフラスコやジャーを用いた回分培養によって得られた培養液の保存時に適用することも可能であり、回収液内の生理活性タンパク質の安定化を図ることができる。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
(C12P 21/00 C12R 1:91)				
(C12P 21/08 C12R 1:91)				
(72)発明者 東 辰雄 千葉県茂原市東郷1900番地 三井東圧化学株式会社内			(72)発明者 里澤 昇 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学株式会社内	
(72)発明者 村中 英一 千葉県茂原市東郷1900番地 三井東圧化学株式会社内			(72)発明者 池田 一郎 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学株式会社内	
(72)発明者 高木 司郎 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学株式会社内			(72)発明者 川嶋 伸広 千葉県茂原市東郷1144番地 三井東圧化学株式会社内	
			(72)発明者 相川 敏和 千葉県茂原市東郷1900番地 三井東圧化学株式会社内	